

## PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 04-320642

(43)Date of publication of application : 11.11.1992

(51)Int.Cl.

A23C 9/123  
C12N 1/20  
//(C12N 1/20  
C12R 1:01 )

(21)Application number : 03-112402 (71)Applicant : YUKIJIRUSHI ROORII KK  
SNOW BRAND MILK PROD  
CO LTD

(22)Date of filing : 17.04.1991 (72)Inventor : YOSHINO YASUSHI  
KATO IKUO  
SHIRAIWA KIYOTAKA  
MIHASHI SHIGEYUKI

(54) NEW LACTOBACILUS BIFIDUS HAVING ACID RESISTANCE AND OXYGEN RESISTANCE

(57)Abstract:

PURPOSE: To provide the subject Lactobacillus bifidus having specific mycological properties, exhibiting a high survival rate in fermented milk products such as drink yogurts and acidic milk beverages and useful for health control.

CONSTITUTION: The objective Lactobacillus bifidus, preferably Bifidobacterium breve SBR3212, is obtained by screening bacteria exhibiting excellent aerobic multiplication abilities from bacteria separated from the feces of a health mother milk-nurtured infant and subsequently treating the screened bacteria with a sterilized acetic buffer solution having pH 4.3, and exhibits following mycological characteristics: acid resistance at least exhibiting the survival of the bacterium when the bacterium is suspended in a sterilized acetic acid buffer solution having pH 4.3, and left at 25° C for 7 days; acid resistance at least exhibiting the survival of the bacterium when the bacterium is cultured in a reducing defatted milk, cooled to 5° C immediately when the pH reaches 4.1, and subsequently left at the 5° C for 7 days; and oxygen resistance at least exhibiting the multiplication of the bacterium when the bacterium is cultured in a reducing defatted milk with stirring for 48hrs.

## LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision  
of rejection]

[Kind of final disposal of application  
other than the examiner's decision of  
rejection or application converted  
registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's  
decision of rejection]

[Date of requesting appeal against  
examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平4-320642

(43) 公開日 平成4年(1992)11月11日

(51) Int.Cl. <sup>5</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
A 2 3 C 9/123		6977-4B		
C 1 2 N 1/20		A 7236-4B		
// (C 1 2 N 1/20				
C 1 2 R 1:01)				

審査請求 未請求 請求項の数2(全 7 頁)

(21) 出願番号 特願平3-112402

(22) 出願日 平成3年(1991)4月17日

(71) 出願人 591058404

雪印ローリー株式会社

愛知県名古屋市中区丸の内2丁目8番5号

(71) 出願人 000006699

雪印乳業株式会社

北海道札幌市東区苗穂町6丁目1番1号

(72) 発明者 吉野 泰

埼玉県川越市南台2丁目4番地6 サンバ

レスビル203号

(72) 発明者 加藤 育男

埼玉県川越市南台2丁目4番地6 サンバ

レスビル301号

(74) 代理人 弁理士 藤野 清也

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 耐酸性及び酸素耐性を有する新規ビフィズス菌

(57) 【要約】

【目的】 耐酸性及び酸素耐性を有するビフィズス菌の新規菌株の提供

【構成】 生後数ヶ月の健康な母乳栄養児の糞便から分離され、(1) pH4.3の酢酸・酢酸ナトリウム緩衝液中で5℃、7日間保持したときに生残し、(2) 還元脱脂乳で培養し、pH4.1に達したときに急冷して5℃、7日間保持したときに生残し、(3) 攪拌還元脱脂乳で48時間培養したときに増殖を示すビフィドバクテリウム・ブレーベ (*Bifidobacterium breve*)。

【効果】 ドリンクヨーグルト、酸性乳飲料等の発酵乳製品中で高い生存率を示し、健康管理上有用である。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 下記の菌学的性質を示すビフィドバクテリウム・ブレーベ (*Bifidobacterium breve*)。

(1) 菌体をpH4.3の滅菌酢酸緩衝液に懸濁し、5℃で7日間保持した時、少なくとも生残を示す耐酸性。

(2) 菌体を還元脱脂乳で培養し、pHが4.1に達したら急冷して5℃で7日間保持した時、少なくとも生残を示す耐酸性。

(3) 菌体を攪拌還元脱脂乳で48時間培養した時、少なくとも増殖を示す酸素耐性。

【請求項2】 菌株がビフィドバクテリウム・ブレーベ (*Bifidobacterium breve*) SBR3212 (微工研菌寄第11915号)である請求項1に記載のビフィドバクテリウム・ブレーベ。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、耐酸性及び酸素耐性を有する新規なビフィドバクテリウム・ブレーベ (*Bifidobacterium breve*) に関する。本発明のビフィドバクテリウム・ブレーベは、耐酸性及び酸素耐性が良好であるので、発酵乳のスターターとして有用である。

## 【0002】

【従来の技術】 一般的に、ビフィズス菌は、乳幼児から老人に至るまで人の健康と深く関わっているといわれている。現在、ビフィズス菌を利用した医薬品や食品は大変多く、特に発酵乳(ヨーグルト)などの乳製品に多く使われている。しかしながら、この商品の中で高い生菌数を維持しているものは少ない。これは、ビフィズス菌がその生存に嫌気条件を必要とし、発酵乳のような低pH域では生存し難いこと、また、栄養要求性が複雑で酵母エキスのような生育促進物質の添加を必要とすること等が挙げられる。

【0003】 このような点からビフィズス菌の耐酸性株、酸素耐性株について研究が行われ、ビフィドバクテリウム・ビフィダム (*Bifidobacterium bifidum*) については、耐酸性変異株の存在、及びその菌株による発酵乳の製造法(特公昭56-42250号公報)、耐酸性株を用いての酸性乳の製造法(特開昭61-205481号公報)、ビフィドバクテリウム・ブレーベ (*B. breve*) については、酸素耐性変異株の存在、及びその菌株による発酵乳の製造法(特公昭59-53031号公報)、耐酸性株を用いての酸性乳の製造法(特開昭61-205481号公報) ビフィドバクテリウム・ロンガム (*B. longum*) については、耐酸性変異株の存在、及びその菌株による発酵乳の製造法(特開昭59-53829号公報)、過酸化水素耐性変異株の存在、及びその菌株による培養組成物(特開昭61-185182号公報)等が、現在までに知られている。また、発酵乳などへの使用菌種としては、乳幼児にはビフィドバクテリウム・ブレーベ (*B. breve*)、幼児から成人用にはビフィ

ドバクテリウム・ロンガム (*B. longum*) が推奨されている(化学と生物 Vol. 21, No. 1, 8~9頁)。

## 【0004】

【発明が解決しようとする課題】 本発明者らは、ビフィズス菌の利用におけるこのような現状に鑑み、発酵乳等の乳製品中で高い生菌数で生存し得る乳酸菌、換言すれば高い耐酸性、及び酸素耐性を示す乳酸菌を探索した。その結果、母乳栄養児の糞便からこのような性質をもつ乳酸菌を発見し、これを発酵乳のスターターとして使用し得ることを見出し、本発明を完成した。

【0005】 すなわち、本発明の目的は、高い耐酸性及び酸素耐性をもち、発酵乳のスターターとして用いることができる乳酸菌を提供することにある。

## 【0006】

【課題を解決するための手段】 本発明は、高い耐酸性及び酸素耐性を示すビフィドバクテリウム・ブレーベに関する。

【0007】 本発明の耐酸性は、(1) 菌体をpH4.3の滅菌酢酸緩衝液に懸濁し、5℃で7日間保存したとき、少なくとも生残を示し、かつ(2) 菌体を還元脱脂乳で培養し、pH4.1に達したとき急冷して5℃で7日間保存しても少なくとも生残を示すものである。また、さらに(3) 酸素耐性は、菌体を攪拌還元脱脂乳で48時間培養したとき、少なくとも増殖を示すものである。

【0008】 本発明は、ビフィドバクテリウム・ブレーベのなかで強い耐酸性を有する菌株を得るために、各種の試料を用いて検索したところ、健康な母乳栄養児の糞便から分離した菌株のなかに好氣的発育の優れたものを見出し、これを選び出し、さらに低pHの酢酸緩衝液で数回処理し、そのなかから最も生育性に優れた菌株ビフィドバクテリウム・ブレーベSBR3212を分離した。この菌株は、ビフィドバクテリウム・ブレーベの菌学的性質を示すが、さらに高い耐酸性及び酸素耐性を有する点で新規であり、微工研に微工研菌寄第11915号として寄託されている。

【0009】 本発明の新菌株は、全乳、脱脂乳、又は還元乳などからなる牛乳培地、あるいは乳糖またはグルコース等を主成分とする合成あるいは半合成培地に接種培養することによってビフィドバクテリウム菌を含有する生残性の高い乳酸菌スターターを得ることができる。

【0010】 そして、この乳酸菌スターターを用いてドリンクヨーグルト、酸性乳飲料等の発酵乳を製造すると生菌数の高い発酵乳を得ることができる。

【0011】 次に、本発明の高い耐酸性及び酸素耐性をもつビフィドバクテリウム・ブレーベの分離方法を具体的に説明する。生後数ヶ月の母乳栄養児8名の糞便から光岡の方法(1980年叢文社発行 光岡知足著「腸内細菌の世界」53~92頁)に従って分離操作を行ってビフィズス菌25菌株を得た。このうちビフィドバクテリウム・

プレーベは13菌株であった。

【0012】この菌株13株をまず酸素耐性菌株のスクリーニングを行った。すなわち、この菌株をブリッグスリバープロス (Briggs liver broth) (光岡知足：臨床検査、18、1163～1172頁 (1974)) 中で培養し、集菌洗浄し、原液の2倍濃度の菌体液を調製した。この菌体液を、0.5%酵母エキス入り12%還元脱脂乳 (18×180mm試験管) に2%接種し、10秒間激しく攪拌し、37℃で24時間培養した。培養物のカード形成性、乳酸酸度及びpHを測定し、少なくとも培養物のカード形成を示した菌株を酸素耐性株とした。13菌株から、酸素耐性株2株を得た。

【0013】次に、この酸素耐性株2株を用いて耐酸性菌株のスクリーニング試験を行なった。すなわち、酸素耐性株をブリッグスリバープロスで培養し、集菌洗浄し、原液の2倍濃度の菌体液を調製した。この菌体液を、pH4.3の1/100M酢酸緩衝液 (18×180mm試験管) に5%分散し、5℃、3日間保存し、BL平板寒天培地 (日本製薬製) で37℃、72時間嫌気培養を行なった。このような培養によって出現したコロニーをブリッグスリバープロスで37℃、24時間培養を行なった。このようにして得られた培養液を用い、前記菌体液の調製、嫌気培養及び出現したコロニーをブリッグスリバープロスでの培養を繰り返して3回行い、最終操作でBL平板寒天培地に形成されたコロニーを耐酸性菌とした。この結果、前記酸素耐性株から耐酸性菌1株を得た。この菌株をビフィドバクテリウム・プレーベSBR3212株とし、微工研に寄託した。この菌の受託番号は、微工研菌寄第11915号であった。

【0014】次に本発明の耐酸性及び酸素耐性をもつ菌株の菌学的性質を示すと次のとおりである。1. 分類学的性状

(1) 菌 形 (光学顕微鏡による観察)

BL寒天平板培地を用い、37℃、48～72時間スチールウール法により嫌気培養したとき

大きさ：0.5±0.3×1.1±0.5μm

形 状：棍棒状あるいは分岐状の菌形を示す

(2) グラム染色性前記(1)と同一条件で培養したとき陽性あるいは弱陽性を示す

(3) コロニー形態

前記(1)と同一条件で培養したときのコロニーの形態は次のとおりである

10 形 状：円 形

隆 起：円錐状あるいは凸円状

周 縁：円 滑

大きさ：1～3mm

色 調：白褐色あるいは赤褐色

表 面：円滑で光沢有り

(4) 芽胞形成：陰 性

(5) ガス産生：陰 性

(6) 運動性：陰 性

(7) カタラーゼ活性：陰 性

20 (8) ミルク凝固性：陽 性

(9) ゼラチン液化性：陰 性

(10) 硝酸塩還元性：陰 性

(11) インドール産生：陰 性

(12) 硫化水素産生：陰 性

(13) 酢酸/L(+)乳酸のモル比：1.7±0.3

【0015】(14) 糖の発酵性

光岡の方法 (光岡知足：臨床検査、18、1163～1172頁 (1974年)) に従い実施した。また、ビフィドバクテリウム・プレーベに属する菌株ATCC15700及びJCM7016についても同様に試験を行なった。結果を表1に示す。

【0016】

【表1】

	SBR3212	ATCC15700	JCM7016
アラビノース	-	-	-
キシロース	-	-	-
ラムノース	-	-	-
リボース	+	+	+
グリコース	+	+	+
マンノース	+	+	+
フラクトース	+	+	+
ガラクトース	+	+	+
シュクロース	+	+	+
マルトース	+	+	+
セロビオース	+	+	+
ラクトース	+	+	+
トレハロース	+	-	+
メリビオース	+	+	+
ラフィノース	+	+	+
メレチトリン	-	-	-
デキストリン	+	+	-
でん粉	-	+	-
グリコーゲン	-	+	-
イヌリン	-	-	-
マンニトール	+	+	+
ソルビトール	+	+	+
イノシトール	-	-	-
エスクリン	+	+	+
サリシン	+	+	+
アミダグリン	+	+	+
α-メチル			
グルコシド	+	+	+

【0017】以上の性状より、本発明のSBR3212は、Bergey's Manual of Systematic bacteriology (Williams & Wilkins, 1986年)、「腸内細菌の世界」(光岡知足著、叢文社、1980年)の分類基準を参照して、ビフィドバクテリウム・ブレーベ (*Bifidobacterium breve*) であると同定した。

2. さらに、本発明のSBR3212菌株について従来のビフィドバクテリウム・ブレーベとの詳細な菌学的性質の比較試験を行なった。すなわち、SBR3212、ATCC15700、JCM7016、市販商品からの分離株Aの4菌株のビフィドバクテリウム・ブレーベを用いて、次の方法により試験をした。

【0018】(1) 耐酸性 (低pH緩衝液) の比較試験  
(1) 方法

①ブリッグス リバー プロスにて37℃、24時間培養後、洗浄、集菌する。② 集菌したものを滅菌生理食塩水 (L-システイン塩酸塩0.1%、チオグリコール酸Na 0.1%入り) にて原菌液の4倍濃度にする。③ この菌液を各pHの緩衝液 (17×100mmファルコンチューブに5ml分注) に5%の割合で添加、

混合し、最終的に3.8、4.0、4.3、4.6、5.0の5段階のpHになるよう調整し5℃に保存し、生菌数を経時的に測定した。緩衝液は、1/100モルの酢酸・酢酸Naの酢酸緩衝液を使用した。また、生菌数は、光岡の方法〔臨床検査、18、1163~1172 (1974)〕に従い血液を加えないBL平板寒天培地を用いてスチールウール法で37℃、72時間の嫌気培養で測定した。

【0019】(2) 結果

30 結果を表2に示す。表2から明かなように、SBR3212はいずれのpHにおいても他の3菌株より生残性が高く、特にpH3.8~4.3の低pH域においてその差が顕著であった。即ち、SBR3212を5℃で10日間保存した場合、pH4.3において37.69%、pH4.0において7.10%、pH3.8において0.31%の生残率を示すのに対して、他の3菌株はpH4.3以下において生残率がいずれも1%未満だった。

【0020】

40 【表2】

pH	菌 株	保 存 日 数							
		0		5		7		10	
		生 菌 数	生 残 率	生 菌 数	生 残 率	生 菌 数	生 残 率	生 菌 数	生 残 率
5.0	SBR3212	$1.1 \times 10^8$	100.00	$9.6 \times 10^7$	87.27	$7.3 \times 10^7$	66.36	$4.6 \times 10^7$	41.82
	ATCC15700	$2.6 \times 10^8$	100.00	$1.0 \times 10^8$	38.46	$3.1 \times 10^7$	11.92	$1.1 \times 10^7$	4.23
	JCM7016	$1.5 \times 10^8$	100.00	$7.4 \times 10^7$	4.93	$2.7 \times 10^6$	1.80	$1.5 \times 10^5$	1.00
	分離株A	$5.0 \times 10^8$	100.00	$1.5 \times 10^8$	30.00	$1.3 \times 10^8$	26.00	$7.4 \times 10^7$	14.80
4.6	SBR3212	$1.2 \times 10^8$	100.00	$8.7 \times 10^7$	72.50	$7.6 \times 10^7$	63.33	$5.6 \times 10^7$	46.67
	ATCC15700	$3.3 \times 10^8$	100.00	$6.3 \times 10^7$	19.09	$1.9 \times 10^7$	5.76	$8.3 \times 10^6$	2.52
	JCM7016	$2.5 \times 10^8$	100.00	$7.0 \times 10^7$	0.28	$6.4 \times 10^6$	0.26	$1.6 \times 10^5$	0.06
	分離株A	$5.7 \times 10^8$	100.00	$1.2 \times 10^8$	21.05	$5.4 \times 10^7$	9.47	$2.7 \times 10^7$	4.74
4.3	SBR3212	$1.3 \times 10^8$	100.00	$7.5 \times 10^7$	57.69	$7.1 \times 10^7$	54.62	$4.9 \times 10^7$	37.69
	ATCC15700	$4.4 \times 10^8$	100.00	$4.3 \times 10^7$	9.77	$1.5 \times 10^7$	3.41	$4.3 \times 10^6$	0.98
	JCM7016	$2.2 \times 10^8$	100.00	$7.0 \times 10^7$	0.32	$1.6 \times 10^6$	0.07	$7.4 \times 10^5$	0
	分離株A	$4.5 \times 10^8$	100.00	$5.8 \times 10^7$	12.89	$2.3 \times 10^7$	5.11	$5.9 \times 10^6$	1.31
4.0	SBR3212	$1.0 \times 10^8$	100.00	$4.2 \times 10^7$	42.00	$2.3 \times 10^7$	23.00	$7.1 \times 10^6$	7.10
	ATCC15700	$5.3 \times 10^8$	100.00	$2.3 \times 10^7$	4.34	$1.3 \times 10^7$	2.45	$1.2 \times 10^6$	0.23
	JCM7016	$1.1 \times 10^8$	100.00	$10^8$ 以下	0	$2.6 \times 10^6$	0.02	$5.0 \times 10^5$	0
	分離株A	$5.3 \times 10^8$	100.00	$7.7 \times 10^7$	1.45	$1.9 \times 10^6$	0.36	$1.6 \times 10^5$	0.03
3.8	SBR3212	$1.0 \times 10^8$	100.00	$1.1 \times 10^8$	11.00	$2.2 \times 10^7$	2.20	$3.1 \times 10^6$	0.31
	ATCC15700	$3.6 \times 10^8$	100.00	$1.2 \times 10^7$	3.33	$5.7 \times 10^6$	1.58	$1.8 \times 10^5$	0.05
	JCM7016	$1.0 \times 10^8$	100.00	$10^8$ 以下	0	$4.2 \times 10^5$	0	$10^8$ 以下	0
	分離株A	$2.9 \times 10^8$	100.00	$1.0 \times 10^6$	0.34	$1.1 \times 10^5$	0.04	$1.0 \times 10^5$	0

注：生菌数：1ml当たりの菌数  
生残率：%

【0021】(2) 耐酸性(還元脱脂乳)の比較試験  
前記試験結果から生残性の劣る分離株Aを除き、SBR3212、ATCC15700、JCM7016の3菌株のピフィドバクテリウム・プレーベを用いて、次の方法により試験をした。

(1) 方法

① 0.5%酵母エキス(Difco)入り、12%還元脱脂乳を115℃、20分間滅菌後、2%接種し、37℃、18時間培養し、スターターとした。② 次に、0.3%酵母エキス入り10%還元脱脂乳(18×180mm試験管に10ml分注)を115℃、20分間滅菌後、\*

\*上記スターターを2%接種し、37℃で培養した。③培養物がpH4.6及び4.1に達したら急冷し、5℃に保存し、生菌数を経時的に測定した。

【0022】(2) 結果

結果を表3に示す。表3よりSBR3212は、pH4.6において7日目で他の2菌株とほぼ同じ生残率を示した。しかし、pH4.1においては、7日目で8.21%と高い生残率を示したのに対して他の2菌株は0.001%未満だった。

【0023】

【表3】

pH	菌 株	保 存 日 数							
		0		3		5		7	
		生 菌 数	生 残 率	生 菌 数	生 残 率	生 菌 数	生 残 率	生 菌 数	生 残 率
4.6	SBR3212	$7.1 \times 10^7$	100.00	$7.2 \times 10^7$	10.14	$1.9 \times 10^6$	2.68	$3.5 \times 10^5$	0.49
	ATCC15700	$2.7 \times 10^7$	100.00	$3.6 \times 10^6$	13.33	$1.2 \times 10^6$	4.44	$7.0 \times 10^5$	2.59
	JCM7016	$7.2 \times 10^7$	100.00	$1.2 \times 10^7$	16.67	$2.7 \times 10^7$	3.75	$2.4 \times 10^6$	0.33
4.1	SBR3212	$8.4 \times 10^7$	100.00	$6.3 \times 10^6$	7.50	$9.9 \times 10^5$	11.79	$6.9 \times 10^5$	8.21
	ATCC15700	$1.9 \times 10^8$	100.00	$1.1 \times 10^6$	0.06	$7.8 \times 10^5$	0	$3.0 \times 10^5$	0
	JCM7016	$2.9 \times 10^8$	100.00	$3.8 \times 10^5$	0.13	$1.4 \times 10^4$	0	$7.0 \times 10^3$	0

注：生菌数：1ml当たりの菌数

生残率：%

【0024】(3) 好氣的生育性試験  
SBR3212、ATCC15700、JCM7016の3菌株のピフィドバクテリウム・プレーベを用いて、次の方法により試験を行った。

(1) 内 容

① 上記各菌株をスターターとして0.5%酵母エキス入り12%還元脱脂乳(115℃、20分間滅菌)培地にて37℃、18時間培養した。② 16%還元脱脂乳150mlを300ml容量の三角フラスコに入れ、綿栓を施し115℃、20分間滅菌後、37℃まで撹拌冷

却した。その後、上記スターターを2%接種し攪拌分散後、37℃で培養を行い生菌数、乳酸酸度、pHを経時的に測定した。また、増殖率(%)=各時間生菌数/初期生菌数×100を算出した。

#### 【0025】(2) 結果

結果を表4に示す。表4から明らかなようにSBR32\*

\*12は、培養時間24時間後に増殖率1000%以上となり、48時間後にも500%を維持していた。一方、他の2菌株は24時間後に増殖率400%程度で48時間後には50%以下と増殖性を示さなかった。

#### 【0026】

【表4】

菌 株	項 目	培 養 時 間 (時間)				
		0	18	24	42	48
SBR 3212	乳酸酸度	0.41	0.58	0.68	0.88	0.92
	pH	5.95	5.43	5.27	4.96	4.91
	生菌数	$4.4 \times 10^7$	$3.4 \times 10^8$	$4.5 \times 10^8$	$1.9 \times 10^9$	$2.2 \times 10^9$
	増殖率	100.00	772.73	1022.73	431.82	500.00
ATCC 15700	乳酸酸度	0.39	0.59	0.65	0.79	0.84
	pH	5.96	5.46	5.30	5.08	5.00
	生菌数	$1.1 \times 10^8$	$3.9 \times 10^8$	$4.7 \times 10^8$	$1.9 \times 10^9$	$5.4 \times 10^9$
	増殖率	100.00	354.55	427.27	172.73	49.09
JCM 7016	乳酸酸度	0.42	0.49	0.52	0.55	0.59
	pH	5.90	5.74	5.60	5.52	5.47
	生菌数	$1.6 \times 10^7$	$3.8 \times 10^7$	$6.7 \times 10^7$	$3.7 \times 10^7$	$2.0 \times 10^8$
	増殖率	100.00	237.50	418.75	231.25	12.50

注) 生菌数 : 1ml当たりの菌数

乳酸酸度 : %

#### 【0027】

【発明の効果】現在までに知られているビフィズス菌の耐酸性株、酸素耐性株は、ビフィドバクテリウム・ビフィダムの耐酸性及び酸素耐性株、ビフィドバクテリウム・プレーベの酸素耐性株あるいは耐酸性株、ビフィドバクテリウム・ロンガムの耐酸性あるいは過酸化水素耐性株などが挙げられる。しかしながら、ビフィドバクテリウム・プレーベの耐酸性と酸素耐性の両特性を持つ菌株は、知られていなかった。そこで、本発明者らは、健康な母乳栄養児の糞便から分離した中で好氣的発育に優れたものを選び出し、さらに低pHの緩衝液で処理したものの中から最も生育性に優れた菌株SBR3212を分離した。

【0028】さらに、この分離株SBR3212の性状把握試験を行った。その結果は、(1)分類学的性状試験からビフィドバクテリウム・プレーベに属する菌株であると同定した。

(2) 耐酸性(低pH緩衝液)の比較試験からpH3.8、4.0、4.3、4.6、5.0のいずれのpHにおいても他のB. breveの3菌株(ATCC15700、JCM7016、市販品分離株A)より生存性が高く、特に5℃で10日間保存した場合、pH4.3において37.69%、pH4.0で7.10%、pH3.8で0.31%の生存性を示すのに対して、他の3菌株はpH4.3以下において生存率がいずれも1%未満だった。

(3) 耐酸性(還元脱脂乳)の比較試験では、生存性の劣る市販品分離株Aを対照から除き試験を行った。この

試験からpH4.6では、他の2菌株と5℃、7日間の保存でほとんど差がなかった。しかし、pH4.1では、7日目8.21%の生存率を示すのに対して、他の2菌株は0.001%未満の生存率を示し顕著な差があった。

(4) 好氣的生育性試験では、培養時間24時間後に増殖率1000%以上となり、48時間後にも500%を維持していた。一方、他の2菌株は24時間後に増殖率400%程度で48時間後には50%以下と増殖性を示さなかった。このことから、溶存酸素を多く含んだ還元脱脂乳培地において増殖性があると考えられる。

【0029】このように、SBR3212は、(2)、

(3)の低pH緩衝液及び還元脱脂乳培養物において、生存率が他のB. breveの生存率との間には顕著な差が認められ、優れた耐酸性を有する。また、(4)の好氣的生育性でも増殖率が他のビフィドバクテリウム・プレーベの増殖率との間には差が認められ、酸素耐性も有する。このことは、SBR3212が優れた耐酸性と酸素耐性を持ち、従来の文献に記載されていない優れた新規菌株である。

【0030】また、この菌株を使用する培養物、その加工物での保存中の生菌数は、低下が少なく広いpH域の飲食物への加工が可能であり、特に、ドリンクヨーグルト、酸性乳飲料等への使用には、高い生菌数を維持できる。また、整腸剤として使用することができる。さらに飼料に添加することもできる。

#### 【0031】

【実施例1】18%還元脱脂乳を滅菌後、攪拌冷却した



培地にあらかじめ培養しておいたビフィドバクテリウム・プレーベSBR3212スターターとラクトバチルス・カゼイ (*Lactobacillus casei*) スターターをそれぞれ1%ずつ接種し、37℃で18時間、好氣的条件下で培養した。この培養液5000mlと蔗糖800gを含むシロップ5000mlとを混合し、均質機で均質化して発酵乳を得た。製造直後の製品の乳酸酸度0.80%、pH4.30でビフィドバクテリウム・プレーベSBR3212の生菌数 $2.0 \times 10^9$  /ml、ラクトバチルス・カゼイの生菌数 $6.5 \times 10^8$  /mlであり、保存7日目でビフィドバクテリウム・プレーベSBR3212の生菌数 $5.3 \times 10^7$  /ml、ラクトバチルス・カゼイの生菌数 $5.8 \times 10^8$  /mlとなり、ビフィドバクテリウム・プレーベSBR3212の生残率は2.7%であった。

## 【0032】

【実施例2】18%還元脱脂乳を滅菌後、攪拌冷却した培地にあらかじめ培養しておいたビフィドバクテリウム・プレーベSBR3212スターターを2%接種し、37℃で48時間、好氣的条件下で培養した。同様にラクトバチルス・カゼイスターターも37℃で48時間培養した。培養後、ビフィドバクテリウム・プレーベSBR3212培養液2500mlとラクトバチルス・カゼイ培養液2500mlと蔗糖800gを含むシロップ5000mlとを混合し、酸味料を加えてから均質機で均質

化して発酵乳を得た。製造直後の製品の乳酸酸度0.73%、pH4.54でビフィドバクテリウム・プレーベSBR3212の生菌数 $1.2 \times 10^8$  /ml、ラクトバチルス・カゼイの生菌数 $7.8 \times 10^8$  /mlであり、保存7日目でビフィドバクテリウム・プレーベSBR3212の生菌数 $1.1 \times 10^7$  /ml、ラクトバチルス・カゼイの生菌数 $6.3 \times 10^8$  /mlとなり、ビフィドバクテリウム・プレーベSBR3212の生残率は9.2%であった。

## 【0033】

【実施例3】ポリペプトン40g、ミートエキス20g、酵母エキス40g、乳糖120g、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  20g、 $\text{K}_2\text{HPO}_4$  4g、L-アスコルビン酸ナトリウム2gを含む4000mlの培地を濾過滅菌した。そして、先に同一組成の培地により37℃で18時間培養したビフィドバクテリウム・プレーベSBR3212のシードカルチャー200mlを前記の培養液に接種し、37℃で18時間培養した。培養後の生菌数は、 $3.2 \times 10^9$  /mlであった。次いで、遠心分離機で菌体を集め、培地と同量の95℃で30分間殺菌の生理食塩水に再懸濁し、再度遠心分離して集菌した。得られた菌体を95℃、30分間殺菌した脱脂粉乳100g、グルタミン酸ナトリウム10gを含む1000mlの分散液に懸濁し、凍結乾燥を行った。得られた113gの粉末は、生菌数が $1.0 \times 10^{11}$  /gであった。

フロントページの続き

(72)発明者 白岩 清隆

愛知県小牧市篠岡1丁目6番地 県営篠岡  
住宅8棟501号

(72)発明者 三橋 重之

東京都田無市西原町4丁目3-47 西原グ  
リーンハイツ7-302